

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09162

研究課題名（和文）新規NASH肝発癌モデルマウスを用いた発癌メカニズム解析及び新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Analysis of carcinogenesis mechanism and development of novel therapeutic agents using a novel mouse model of NASH hepatocarcinogenesis

研究代表者

大河内 信弘（Ohkohchi, Nobuhiro）

筑波大学・医学医療系・客員教授

研究者番号：40213673

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：肝発癌のメカニズムを、マイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、HCCに関連する遺伝子群、NAFLDに関連する遺伝子群、発癌に関連する遺伝子群の発現変化が認められた。中でも癌原遺伝子の1つであるSrcはqPCRでも発現上昇を認めた。Srcはヒト肝臓において認められる遺伝子変動であり、SrcがNASH肝発癌の一因となっている可能性が示唆された。耐糖能増悪が癌化を引き起こすと考え、治療薬候補としてヒアルロン酸とSGLT-2阻害薬をモデル動物に投与した。24週における肝体重比、脂肪体重比、腫瘍個数と最大腫瘍径に有意差はなかった。肝臓の病理学的な評価では、肝脂肪化や線維化に有意な差は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタボリックシンドローム患者の増加に伴い、NASH患者数やNASH肝発癌が増加している。これまで肝細胞癌の主な原因であったウイルス性肝炎と異なり、NASH肝発癌に関するメカニズムは解明されておらず、解明および治療薬開発が急務である。当研究では発癌に関するメカニズムについては、Srcが有意な変化がありNASH肝発癌の一因となっている可能性が示唆された。マイクロアレイの解析で耐糖能異常に関わるIrs-1に変動があったことから、SGLT-2阻害剤とヒアルロン酸を治療薬に選定したが、NASH進展抑制や発癌抑制に効果は認めなかった。耐糖能異常が肝発癌に大きく関わっていない可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of hepatocarcinogenesis was comprehensively analyzed by microarray. The results showed that the expression of HCC-related genes, NAFLD-related genes, and carcinogenesis-related genes were up-regulated. Among them, Src, one of the proto-oncogenes, was also up-regulated by qPCR, suggesting that Src may contribute to NASH hepatocarcinogenesis, since Src is a gene variant observed in human hepatocarcinoma. There were no significant differences in liver weight ratio, fat weight ratio, number of tumors and maximum tumor diameter at 24 weeks. Pathological evaluation of the liver showed no significant differences in hepatic steatosis or fibrosis.

研究分野：肝移植、血小板、肝再生、肝細胞癌

キーワード：NASH NASH肝発癌 Src ヒアルロン酸 SGLT-2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦において NASH 患者が急速に増加し、肝細胞癌患者の背景疾患に占める NASH の割合についても増加している。しかし NASH の病態生理については未だ不明な点が多く、その一因として動物実験モデルが臨床におけるヒト NASH との相違点が多く十分な検討ができないことが挙げられていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、当教室で開発した新規 NASH 肝発癌モデル動物を用いて、NASH 肝発癌のメカニズムを解析し、その治療薬を同定することにある。

3. 研究の方法

NASH 肝発癌モデルマウスを用いて、マイクロアレイを用いた網羅的な解析を行う。次に、マイクロアレイと先行実験の結果から治療薬の候補を選定した。網羅的解析から *Irs-1* に変動があることから SGLT-2 阻害薬、先行実験から肝臓洞内皮細胞に特異的受容体があり stellate cell や Kupffer cell に相互作用することで保護効果が認められているヒアルロン酸を使用し、NASH 抑制効果や腫瘍抑制効果の有無について評価を行った。(Tanoi T, Ohkohchi N, et al. Hepatol Res 2016, Sano N, Ohkohchi N, et al. World J Gastroenterol. 2015)

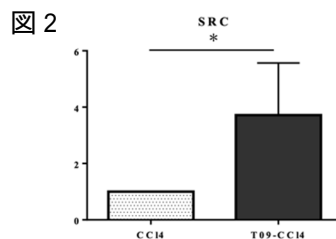
4. 研究成果

(1)新規 NASH 肝発癌モデルは、24 週間高脂肪食と LXR agonist、酸化ストレスとして CCl₄ を投与することで、インスリン抵抗性を生じ、肝臓に NASH に特徴的な病理所見像が認められるようになり、その後肝細胞がんを発症する特徴を持つ。このモデルをマイクロアレイを用いて網羅的に解析を行った。

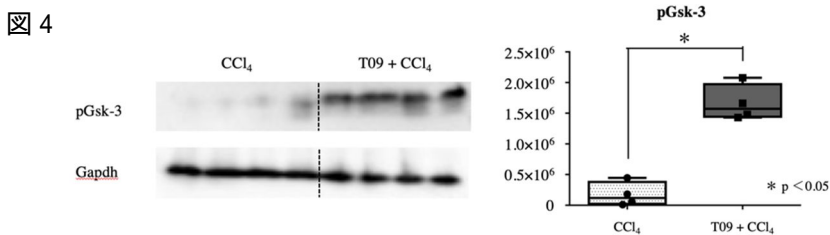
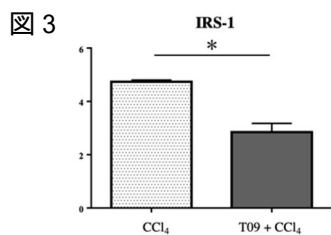
結果は、HCC に関連する遺伝子群、NAFLD に関連する遺伝子群、発癌に関連する遺伝子群の発現変化が認められた(図 1)。癌原遺伝子の 1 つである *Src* は qPCR でも発現上昇が確認された(図 2)。ヒト肝臓においても認められる遺伝子変動であり、このことは *Src* が NASH 肝発癌の一因となっている可能性がある。

図 1

Relation	Gene symbol	Gene name(description)	Fold change	P-value	Regulation
Hepatocellular carcinoma	CFP	complement factor properdin	2.688	0.009	up
	CD5L	CD5 antigen-like	2.371	0.003	up
	VSIG4	V-set and immunoglobulin domain containing 4	2.346	0.014	up
NAFLD	SIRT3	sirtuin 3	0.487	0.036	down
	LPL	lipoprotein lipase	5.120	0.009	up
Apoptosis	UCP2	uncoupling protein 2	2.121	0.042	up
	SRC	Rous sarcoma oncogene	3.755	0.025	up
	FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (Fgr) oncogene homolog	3.142	0.004	up



また *Irs-1* について qPCR で有意な変動があり(図 3)、膵臓細胞障害に関わるとされる *pGSK-3* の western blot 評価でも同様に有意な変化を認めた(図 4)。このことから耐糖能異常が発癌に関与している可能性を考え、SGLT-2 を治療薬の候補とした。



(2)耐糖能異常を改善させる SGLT-2 阻害薬と肝保護作用のあるヒアルロン酸を用いて、モデル作成時に 24 週間薬剤投与を行った(図 5)。

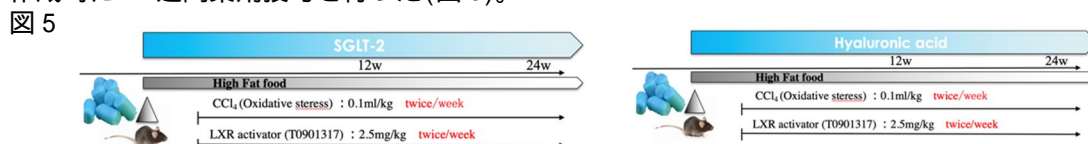
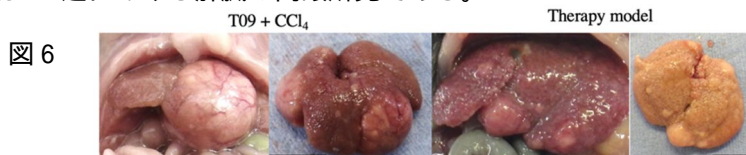


図 6 は 24 週における肝臓の肉眼所見である。



24 週における 肝体重比、脂肪体重比、腫瘍個数と最大腫瘍径に有意差はなかった(図 7-10)。ヒアルロン酸投与モデルにおいては、腫瘍最大径が低い傾向($p=0.085$)があったが、有意差は認めなかった。肝臓の病理学的な評価では、HE 染色、Masson Trichrome 染色、Oil-red-O 染色で NASH となっていることが確認された。また、薬剤投与モデルの両群で NASH 発癌モデルに対して、有意に血糖値が低かった($p=0.05$)(図 11)。また病理学的な効果判定については、薬剤投与モデルにおいて、脂肪化や線維化の程度については有意差は認められず、MT 染色を基にした線維化スコアリングについても有意差は認められなかった(図 12)。結果としては、血糖値に有意な差が認められたものの、薬剤投与による NASH 進展抑制や腫瘍発生の抑制効果は認められなかった。

図 7

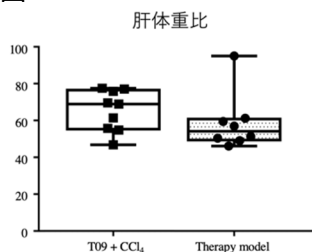


図 8

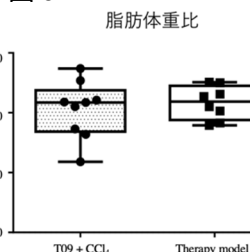


図 9

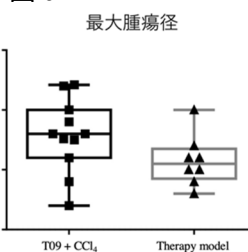


図 10

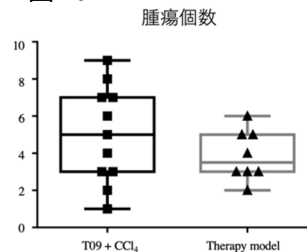


図 11

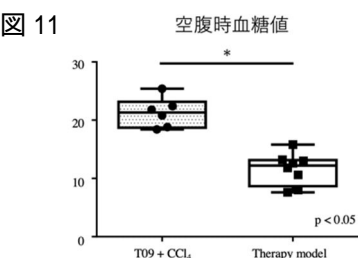
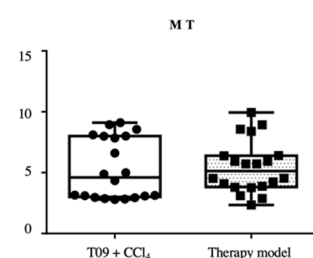


図 12



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimizu Y, Tamura T, Kemmochi A, Owada Y, Ozawa Y, Hisakura K, Matsuzaka T, Shimano H, Nakano N, Sakashita S, Oda T, Ohkohchi N.	4. 巻 36
2. 論文標題 Oxidative stress and Liver X Receptor agonist induce hepatocellular carcinoma in Non-alcoholic steatohepatitis model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 800-810.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jgh.15239.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水義夫
2. 発表標題 新規NASH発癌モデルの開発とマイクロアレイを用いた網羅的解析，第119回日本外科学会総会
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田村 孝史 (Tamura Takafumi) (20633192)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	
研究分担者	高橋 一広 (Takahashi Kazuhiro) (80794528)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------